



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 100 04 801 A 1**

(51) Int. Cl. 7:
C 12 M 1/34
C 12 M 3/04

(21) Aktenzeichen: 100 04 801.3
(22) Anmeldetag: 3. 2. 2000
(43) Offenlegungstag: 9. 8. 2001

(71) Anmelder:
Gausepohl, Heinrich, Dr., 50739 Köln, DE

(72) Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Vorrichtung zur Durchführung von Färbe- und Hybridisierungsreaktionen

(57) Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung komplexer Protokolle in der Immuncytochemie und *in situ* Hybridisierung an biologischen Proben auf Objektträgern oder vergleichbaren Halterungen. Hauptzweck der Erfindung ist es, eine Vorrichtung zur Verfügung zu stellen, mit deren Hilfe derartige Protokolle in einem dafür geeigneten Automaten durchgeführt werden können. Gelöst wird das durch eine Vorrichtung, in die der Träger, z. B. ein Objektträger mit einem Gewebsschnitt, so eingespannt werden kann, daß ein Flüssigkeitsaustausch ohne Öffnen der Vorrichtung erfolgen kann. Die Flüssigkeit wird dabei in einem schmalen Spalt zwischen der Vorrichtung und dem Objektträger so gehalten, daß eine nennenswerte Verdunstung auch bei erhöhter Temperatur vermieden wird.

DE 100 04 801 A 1

DE 100 04 801 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung komplexer Protokolle in der Immuncytochemie und *in situ* Hybridisierung an biologischen Proben auf Objektträgern oder vergleichbaren Halterungen. Hauptzweck der Erfindung ist es, eine Vorrichtung zur Verfügung zu stellen, mit deren Hilfe derartige Protokolle in einem dafür geeigneten Automaten durchgeführt werden können. Gelöst wird das durch eine Vorrichtung, in die der Träger, z. B. ein Objektträger mit einem Gewebsschnitt, so eingespannt werden kann, daß ein Flüssigkeitsaustausch *in* Öffnen der Vorrichtung erfolgen kann. Die Flüssigkeit wird dabei in einem schmalen Spalt zwischen der Vorrichtung und dem Objektträger so gehalten, daß eine nennenswerte Verdunstung auch bei erhöhter Temperatur vermieden wird.

Die Analyse von Genexpressionsmustern oder der Verteilung immunreaktiver Moleküle ist eine gängige Methode in der modernen Biologie und Medizin. Während die meisten solcher Untersuchungen zur Zeit an Gewebsschnitten durchgeführt werden, wächst ein neues Anwendungsfeld rasch heran. Dabei werden Expressionsmuster an Bibliotheken mechanisch auf einen Träger aufgebrachter biologischer Moleküle analysiert. Die Technik ist unter den Namen "Bio-chips", "Mikroarrays" oder "DNA Chips" bekannt. Alle diese Protokolle sind arbeitsintensiv und erfordern eine Reihe von Inkubationen mit verschiedenen Waschflüssigkeiten und Reagenzien. Einige der Schritte müssen bei definierter Temperatur durchgeführt, und in vielen der Schritte muß eine Kontamination mit ubiquitären Enzymen verhindert werden. Der zentrale Schritt ist immer eine Inkubation über oft mehrere Stunden mit einer zu untersuchenden Probe, deren zur Verfügung stehendes Volumen limitiert sein kann. Die Vielzahl der Schritte macht eine Automatisierung der Protokolle wünschenswert.

In der Literatur sind Geräte und Verfahren zur Automatisierung vor allem im Bereich der Immuncytochemie beschrieben [z. B. Wilkinson: *In situ Hybridization*, Oxford IRL Press 1992]. Zur Durchführung einfacher Färbereaktionen [z. B. Gerät von DAKO] und auch komplexerer Protokolle sind Automaten im Markt bekannt [Gerät von Biogenex, Gerät von Ventana]. Alle Automaten haben aber Defizite, wenn für jeden Objektträger eine im Volumen limitierte Menge an Probenmaterial zur Verfügung steht. Darüber hinaus werden in keiner der bekannten Vorrichtungen geschlossene Kammern zur Durchführung der eigentlichen Hybridisierung eingesetzt. Die in der Pathologie verwendeten Färbeautomaten sind per se nicht zur Hybridisierung bei erhöhter Temperatur nutzbar.

Kammern zur manuellen Durchführung der Protokolle sind bekannt und z. B. bei der Firma Sigma-Aldrich erhältlich. Hier wird auf den Objektträger mit Hilfe einer Silikonmaske eine Plastikmembran mit zwei Öffnungen aufgeklebt. Über die Öffnungen sind Flüssigkeiten manuell einzufüllbar und während der Hybridisierung werden die Öffnungen verschlossen. Ein automatisierter Flüssigkeitsaustausch ist nicht vorgesehen und nicht realisierbar.

Die zur Bearbeitung nötigen Schritte und die verwendeten Reagenzien sind sehr ähnlich zu den in der Patentschrift DE 196 50 880 C1 vom 07.12.96 beschriebenen. Die dort beschriebene Vorrichtung bezieht sich aber auf Hybridisierungen an ganzen, d. h., nicht geschnittenen Objekten.

Aufgabe der Erfindung ist es nun, eine Vorrichtung zur Verfügung zu stellen, die die folgenden Bedingungen erfüllt:

- Einschluß des Objektträgers mit dem biologischen Material in der Art, daß über dem Gewebsschnitt oder

der Bibliothek von Sonden eine dünne, abgeschlossene Kammer entsteht

- Zugang zu der Kammer über Öffnungen zur Zu- und Abfuhr von Reagenzien
- Zugänglichkeit für automatischen Flüssigkeitstransfer;

Reduktion der Verdunstung während längerer Inkubationsschritte bei erhöhter Temperatur

- inerte Materialien
- Sterilisierbarkeit

Gelöst wird die Aufgabe durch die in den Zeichnungen 1 beschriebene Vorrichtung und die Merkmale der Patentansprüche. Die erfundungsgemäß Vorrichtung erlaubt die automatisierte Durchführung von Protokollen zur *in situ* Hybridisierung in dafür vorgesehenen Automaten. Dadurch wird eine erhebliche Arbeitserleichterung erreicht und die Durchführung der Experimente wird reproduzierbar.

Zur Durchführung der Experimente wird zunächst auf die 20 Deckplatte nach Zeichnung 1 mit einer flache Dichtung mit einem zentralen Ausschnitt in der Form des Fensters der Deckplatte ausgelegt. Auf diese Dichtung wird der Objektträger mit dem biologischen Material so ausgelegt, daß das zu untersuchende Material im Bereich des Fensters liegt und 25 zur Deckplatte weist.

Dieser Aufbau wird gegebenenfalls durch eine geeignete Klemmvorrichtung zusammengedrückt. Objektträger, Dichtung und Deckplatte bilden nun eine flache Kammer aus, die über zwei Bohrungen in der Deckplatte mit der Außenwelt verbunden ist. In solchen Anordnungen können nun eine 30 Vielzahl von Objektträgern ohne Kontaminationsgefahr bearbeitet oder gelagert werden.

Zur automatisierten Bearbeitung wird nun eine Vielzahl 35 solcher Anordnungen in eine geeignete Klemmhalterung in einen Automaten eingebracht, der Flüssigkeitswechsel vornehmen kann. Falls eine Temperierung erforderlich ist, muß die Aufnahmeverrichtung des Automaten eine solche Temperierung vorsehen.

Die Deckplatten mit den Objektträgern werden so in den 40 Automaten eingesetzt, daß die außen zugängliche Öffnung des Zuführungsstutzens nach oben weist. In der in den Zeichnungen beschriebenen Ausführung liegt dabei die Anordnung flach waagerecht auf, es ist aber auch eine Variante mit vertikaler Ausrichtung der Objektträger realisierbar.

Nun wird über eine der Zuführungsbohrungen die erste 45 Waschflüssigkeit eingebracht. Welche der Bohrungen zur Zufuhr bzw. Abführung von Flüssigkeiten dient, hängt von der jeweiligen Ausführungsform ab. Es ist auch denkbar, daß beide Bohrungen wechselweise benutzt werden können.

Die Patentansprüche decken mehrere sehr ähnliche Varianten ab, die sich vor allem in der Form (Querschnitt) der Bohrungen unterscheiden. In der Zeichnung sind gerade Bohrungen mit identischen Durchmessern dargestellt, denkbar und vorteilhaft sind aber auch kegelförmig zulaufende Bohrungen und verschiedene Durchmesser.

Die Flüssigkeit dringt nun über die Zuführungsbohrung in die Kammer ein und benetzt die innerhalb der Dichtung liegende Fläche des Objektträgers. Je nach Ausführung erfolgt das Eindringen der Flüssigkeit durch Kapillarkräfte, hydrostatischen Druck oder Überdruck beim Einbringen der Flüssigkeit. Zur vollständigen Benetzung und Entfernung aller Luftblasen kann es notwendig werden, die Kammer mit einem mehrfachen ihres Volumens zu überspülen. Die Flüssigkeit läuft durch den Spalt in die gegenüberliegende Bohrung und wird dort aktiv abgesaugt, da Überspülung des Spalts und die Abnahme der Flüssigkeit aus der zweiten Bohrung kann gegebenenfalls durch Schrägstellen der Anordnung unterstützt werden.

Im weiteren Verlauf des Experiments werden nun der Reihe nach in alle Kammern Reagenzien eingebracht. Nach der für jedes Reagenz definierten Reaktionszeit wird das im Protokoll vorgeschene nächste Reagenz eingebracht. Da der Spalt einen engen Querschnitt im Vergleich zur Bohrung aufweist und die Bohrung an ihrem unteren Ende trifft, dringen hier typischerweise keine Luftblasen ein.

Für die Hybridisierung wird die Probe auf dem gleichen Weg eingebracht. Wenn das Volumen limitiert ist, kann die Zuführungsbohrung anschließend mit einer inerten Waschflüssigkeit gefüllt werden. Falls es das Protokoll erfordert, werden Reagenzien aus vorgewärmten Vorratslösungen eingebracht. Alternativ lässt sich die gesamte Klemmhalterung zur Aufnahme der einzelnen Anordnungen ebenfalls temperieren.

Die Verdunstung von Probenflüssigkeit während der oft über bis zu 30 Stunden erfolgenden Hybridisierung bei 40–70°C wird durch einzelne oder mehrere der folgende Maßnahmen verhindert:

- Verschluß der Zuführungsbohrungen mit einem Septum oder einem Deckel mit sehr enger zentrischer Öffnung
- Übersichtung der Flüssigkeit in der Zuführungsbohrungen mit einer schwer verdampfbaren zweiten Flüssigkeit, wie z. B. Glyzerin, Polyethylenglykol oder Öl
- Umbau der gesamten Halterung mit einer befeuchtbaren Kammer
- Ersatz verdunsteter Lösung während der Inkubation.

Nach der Hybridisierung erfolgen typischerweise Waschschritte mit salzhaltigen Lösungen bei definierter Temperatur, die genau so durchgeführt werden wie oben beschrieben. Je nach Protokoll können sich weitere Inkubationen mit einem oder mehreren Nachweisreagenzien anschließen, die im wesentlichen nach dem gleichen Ablauf erfolgen. Zum Schluß wird die Probe salzfrei gespült und steht dann für die Auswertung zur Verfügung. Je nach Protokoll kann die Probe in der Halterung bis zur unmittelbaren Auswertung bearbeitet werden. Falls eine visuelle Kontrolle der letzten Reaktionsschritte notwendig ist, ist solit die Deckplatte aus Glas gefertigt sein. Der Vorteil der Handhabung in einer geschlossenen Halterung bleibt also bis zum Abschluß des Protokolls erhalten.

Der Objekträger wird dann mit der Deckplatte aus der Klemmhalterung herausgenommen und steht nun wie bei manuellen Protokollen zur weiteren Analyse, Bearbeitung oder Lagerung zur Verfügung. Die Deckplatte und Dichtung werden nun durch chemische oder thermische Desinfektion nach gängigen Verfahren gereinigt und stehen dann für weitere Experimente zur Verfügung. Die Klemmhalterung kommt mit dem biologischen Material nicht in Berührung und unterliegt damit weniger stringenten Reinigungsvorschriften.

Legende der Zeichnung

- 1 Grundkörper, Deckplatte
- 2 Hybridisierungsbereich, Bereich der Kammer
- 3 Zulaufbohrung bzw. Ablaufbohrung
- 4 Zulaufbohrung bzw. Ablaufbohrung
- 5 Spalt, Hybridisierungskammer
- 6 optionale Maske, Dichtung

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der

Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objekträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen einer Deckplatte (1) mit Bohrungen (3, 4) für die Zu- und Abfuhr von Flüssigkeiten, dem Objekträger und gegebenenfalls einer Dichtung (6) ein schmaler Spalt (5) zum Überspülen der am Objekträger fixierten Probe besteht.

2. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objekträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß Objekträger und Deckplatte (1) und gegebenenfalls eine Dichtung (6) durch eine Klemmvorrichtung (nicht dargestellt) zusammengedrückt werden.

3. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objekträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß der Objekträger mit Deckplatte (1) und ggf Dichtung (6) horizontal oder mit einem Winkel von nicht mehr als 20° gegen eine temperierbare Platte gedrückt wird.

4. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objekträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Bohrungen so ausgeführt werden, daß ihr Volumen das des Spalts übersteigt und die Bohrung somit als Reservoir dient.

5. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objekträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Bohrungen gerade ausgeführt sind.

6. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objekträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, oder daß die Bohrungen kegelig ausgeführt sind.

7. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objekträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß Flüssigkeiten, die in eine der Bohrungen (3, 4) eingebracht werden, unter Nutzung von Kapillarkräften durch den Spalt bis zur gegenüberliegenden Bohrung fließen.

8. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objekträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltbreite (5) gegenüber dem Durchmesser der Bohrungen (3, 4) so gering ist, daß Luftblasen nicht eindringen.

9. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objekträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltbreite (5) 0,05 bis 2 mm beträgt.

10. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objekträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch ge-

kennzeichnet, daß die Spaltbreite (5) gegebenenfalls nicht über die gesamte Fläche konstant ist sondern erhöhte Flächen zum Auschluß von Luftblasen, zur Reduzierung des Reagenzvolumens oder zum Einschluß nicht völlig fixierter Objekte aufweist.

11. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltbreite (5) durch ein in die Deckplatte eingefrästes Fenster bestimmt wird.

12. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Deckplatte gegebenenfalls zusätzlich eine um das Fenster herum laufende Nut zur Aufnahme einer Dichtung aufweist.

13. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltbreite (5) zusätzlich zu Anspruch 11 durch eine als Maske ausgeformte Dichtplatte mitbestimmt wird.

14. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, oder daß die Deckplatte (1) kein Ester nach Anspruch 11 aufweist und der Spalt ausschließlich durch eine als Maske ausgeformte Dichtplatte bestimmt wird.

15. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Dichtplatte aus einem gegen die verwendeten Reagenzien inertem Material wie Polyolefin, Teflon, Silikon, PVC oder Gummi besteht.

16. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Deckplatte (1) nach Anspruch 1–15 aus einem gegen die verwendeten Reagenzien inertem Material, wie z. B. Glas, Keramik, Teflon, Polyolefin, Polysulfon oder Silikon besteht.

17. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Deckplatte (1) nach Anspruch 1–16 aus Glas besteht und außerhalb des Fensters eine glatte, plane Oberfläche aufweist.

18. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Deckplatte aus Glas oder Silikon ohne weitere Hilfsmittel oder nur mit einem hochviskosen Dichtmittel wie Fett, Öl, Glycerin oder Polyethylenglykol gegen den Objektträger dichtet.

19. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Öffnungen (3, 4) in der Deck-

platte (1) mit einem Septum oder einem Stopfen mit einem kleinen, zentralen Loch verschlossen werden können.

20. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß Flüssigkeiten durch einen Pipettierroboter in die als Reservoir dienenden und gegebenenfalls mit Septum oder Stopfen verschlossenen Bohrungen (3, 4) eingebracht werden können.

21. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß zum Einbringen der Flüssigkeiten eine Kanüle benutzt wird, die über einen Teil ihrer Länge das Loch in dem Stopfen nach Anspruch 15 und 16 abdichtet und einen weiteren, nicht abdichtenden Abschnitt aufweist.

22. Vorrichtung zur Durchführung von Protokollen der Immuncytochemie, in situ Hybridisierung und verwandten Verfahren an biologischem Material auf Objektträgern oder ähnlichen Halterungen, dadurch gekennzeichnet, daß die zum Einbringen der Flüssigkeit benutzte Kanüle nach Anspruch 21 so positioniert wird, daß die Flüssigkeit wahlweise unter Überdruck oder drucklos eingebracht werden kann.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

